Themen der Vorlesung:

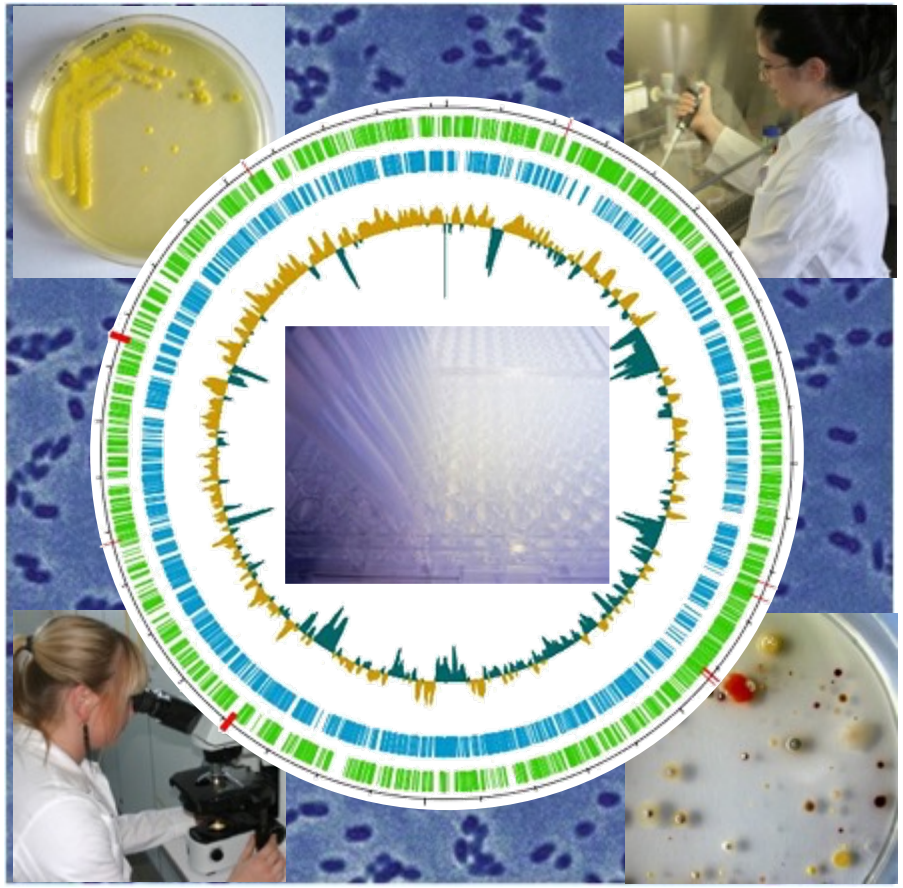
- Praktikumsorganisation
- Mikroskopie
- Steriltechnik

Organisatorisches

Einführung

Sicherheit

Programm des ersten Kurstages



Das Praktikum wird in der Klausur mitgeprüft

Maximal 1 Fehltag erlaubt!

Keine Protokolle

Sie (!!) müssen sich selbstständig in die ausliegenden Anwesenheitslisten eintragen!

Fragen zur Technik und Organisation während des laufenden Praktikums

Beschwerden zum Praktikum
an mich …

… falls nötig auch an:

Dr. Gabi Timmermann

Insgesamt 6 Kurstage/ 2 Durchgänge mit ca. 10-12 Studierenden pro Tag.

Inhalt des 1. Kurstages:

1. Bestimmung der Keimzahl in der Luft
2. Nachweis von Bakterien auf Oberflächen
3. Anreicherung und Isolierung von ***Bacillus subtilis***
4. Anreicherung nitrifizierender Bakterien
5. Anreicherung phototropher Bakterien

Essen, Trinken, Schminken etc. sind im Praktikumsraum strikt verboten!

Taschen, Mäntel und Jacken dürfen nicht mit in den Praktikumsraum genommen werden

Es besteht Kontaminationsgefahr durch Bakterien!

Biogefahrstoffverordnung und Gentechnikgesetz!

Taschen müssen in die Schließfächer

Pro Teilnehmer ein Schlüssel,
nach dem Kurs wieder an das Schlüsselbrett hängen **!**

Schlüsselverlust kostet 10 Euro

Mäntel und Jacken an den Ständer im Nebenraum hängen
oder mit in das Schließfach legen

Biogefahrstoffverordnung und Gentechnikgesetz!

Grundregeln für sicheres Arbeiten im Praktikum

unter COVID 19- Bedingungen

- Bitte immer genug Abstand halten 1,5 m mind.
- Bitter immer die Masken tragen: Dazu bitte die verfügbaren Einmalmasken nutzten.

  Maskenversuch in Woche 2!!
- Bitte die Hände waschen und mit Sterilium reinigen
- Bitte den Markierungen und COVID-spezifischen Hinweisen im Raum folgen
- Bitte regelmäßig lüften!!
- Bitte zudem den spez. Anweisung der Betreuer folgen
- **Kein Zutritt zu den die Forschungslabors der AG**

Grundregeln für sicheres und steriles Arbeiten in Praktikum

- Türen und Fenster geschlossen halten, um Durchzug und Kontaminationen zu vermeiden (gilt in diesem har nur bedingt...unbedingt Lüften!!)
- Arbeitsabläufe vor dem Versuch durchdenken und planen!
  Skript lesen!
- Arbeitsfläche (-tisch) von nicht benötigten Arbeitsmaterialien befreien (Ordnung halten)
- Arbeitsflächen mit 70%-vergälltem EtOH reinigen
- Hände vor Arbeitsbeginn waschen und ggf. mit Sterillium desinfizieren

Prinzipiell besteht im Praktikum die Pflicht:

Tragen von **Schutzkleidung** (Kittel aus Baumwolle, geschlossene Schuhe, lange Hose)

Schutzbrille bei Arbeiten mit ätzenden oder die Augen reizenden Stoffen

Schutzhandschuhe hingegen nur tragen, wenn erforderlich

Falls erforderlich, Arbeiten unter dem **Abzug** durchführen

Ziele der **sterilen (aseptischen) Arbeitstechnik** sind:

- Die Vermeidung einer **Kontamination** (= Verunreinigung) von Nährmedien, Lösungen, Geräten, Reinkulturen von Mikroorganismen durch unerwünschte Keime (unbekannte Bakterien oder Pilze)

- **Schutz der Umwelt und der arbeitenden Personen** vor einer Kontamination bzw. Infektion durch die Versuchskulturen (besonders wichtig bei Arbeiten mit Mikroorganismen ab Sicherheitsstufe 2)

Bitte stets bedenken: Unerwünschte Keime werden vor allem durch die Luft, unsterile Geräte oder den Menschen eingeschleppt

- in der Raumluft: ca. 500 bis 2.000 Keime pro m^3
- einige 1.000 Keime/cm^2 Haut

- Alle (Kultur-)Gefäße oder Röhrchen, die mit Bakterien in Kontakt kommen, müssen eindeutig beschriftet werden
  Verwendete Glasgefäße nach Benutzung in Sammelbehälter lagern und autoklavieren

- Bei Unfällen wie Verschütten oder Verschlucken von Kulturen/Chemikalien, Verbrennungen, Schnittverletzungen oder Verätzungen sofort den Kursleiter/-betreuer verständigen Gefährliche Situationen lassen sich durch vorausschauendes Arbeiten vermeiden

- Es dürfen Keimsuspensionen und gesundheitsschädliche Flüssigkeiten nur mit Pipettierhilfen (nicht mit dem Mund!) pipettiert werden

- Das Verbreiten der Mikroorganismen durch die Luft durch sogenannte Bioaerosole, die beim Pipettieren, Beimpfen oder Schütteln von Bakterienkulturen entstehen, ist zu vermeiden

- Alle Mikroorganismen müssen nach dem Ende der Arbeiten abgetötet (autoklaviert) werden

  Nach Ende der täglichen Arbeiten sind die Arbeitsflächen frei und sauber zu hinterlassen. Gegebenenfalls empfiehlt sich das Abwischen mit einem Desinfektionsmittel

- Vor Verlassen des Labors müssen die Hände gewaschen werden. Die Kittel werden nicht in der Mensa getragen oder mit nach Hause genommen

- sterile Stopfen sowie Pipetten nur am oberen Teil anfassen, um diese durch Handkontakt nicht zu kontaminieren

- Ränder von Glasgeräten, Impfösen und Spateln abflammen

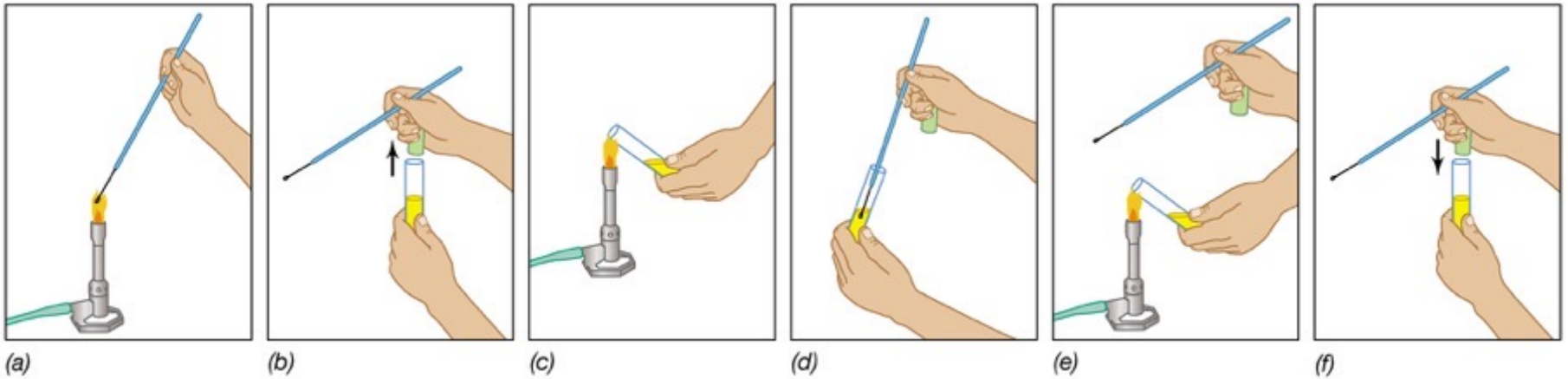
- Bei Arbeiten mit dem Bunsenbrenner: Haare zusammenbinden und bei Nichtgebrauch den Brenner auf Sparflamme schalten oder ausmachen!

Pro Gruppe gibt es ein intaktes Mikroskop
bitte sorgfältig damit umgehen!

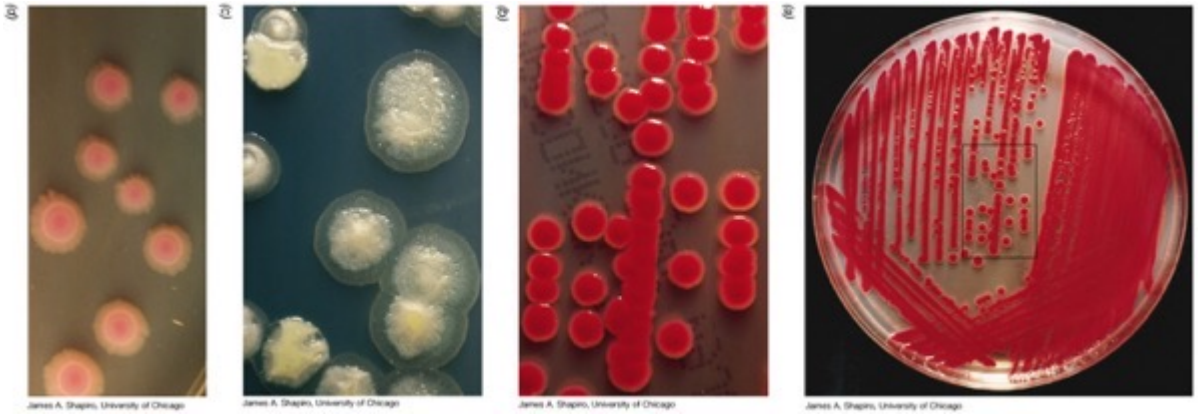
Praktikumsskript

steht in STiNE
zum Download bereit

Aus Kostengründen
gibt es keine Hardcopies

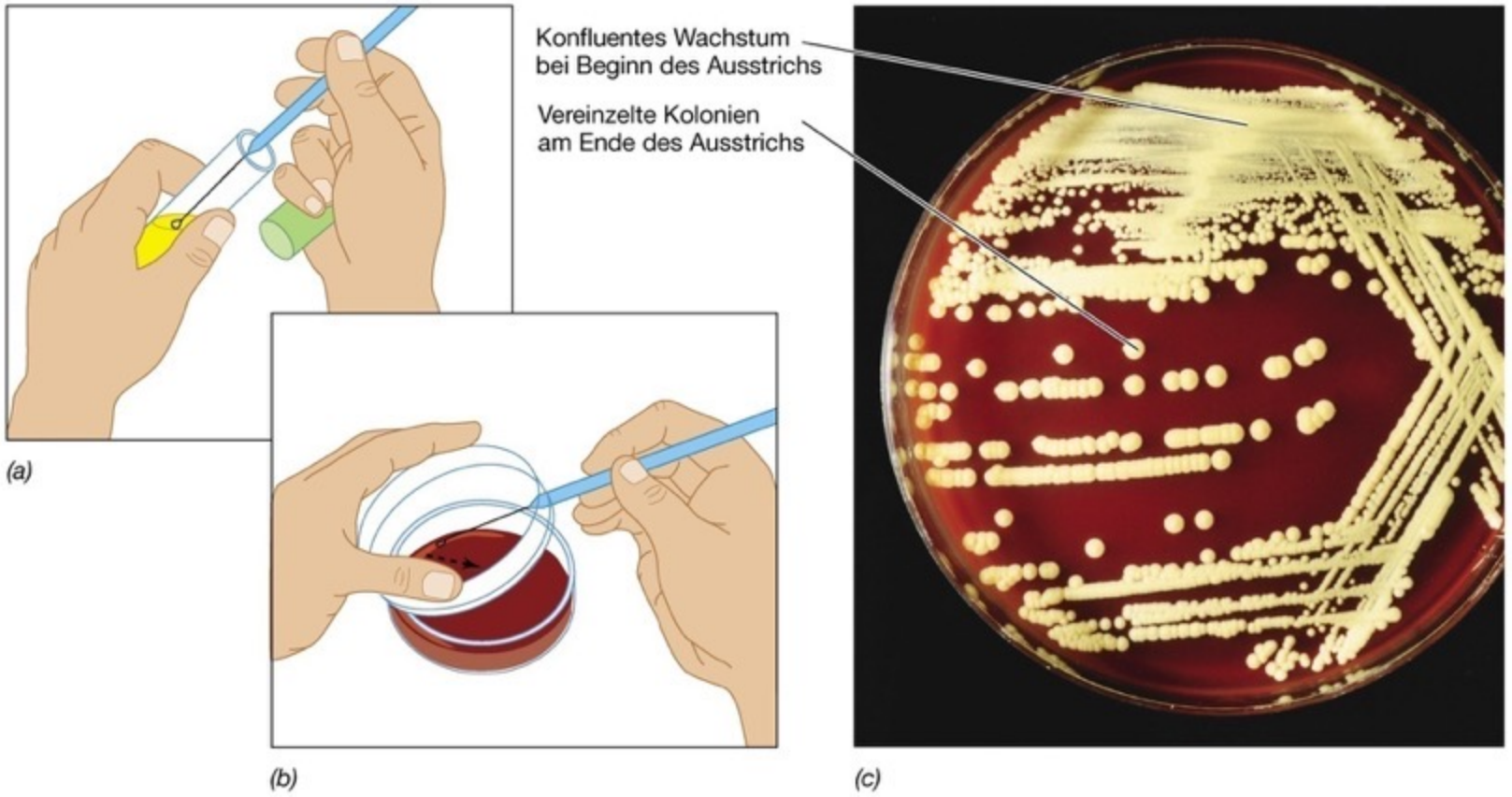


Aseptischer Transfer. (a) Die Öse wird erhitzt bis sie glühend rot ist und dann kurz in der Luft abgekühlt. (b) Der Verschluss wird von dem Röhrchen abgenommen. (c) Die Spitze des Röhrchens wird kurz über die Flamme gehalten. (d) Die Probe wird mit der sterilen Öse aufgenommen. (e) Nachdem die Probe mit der Öse entfernt worden ist, wird das Röhrchen wieder über die Flamme gehalten und dann wird die Probe auf ein steriles Medium übertragen. (f) Die Röhrchen wird wieder verschlossen. Die Öse wird wieder erhitzt, bevor man sie zurücklegt.

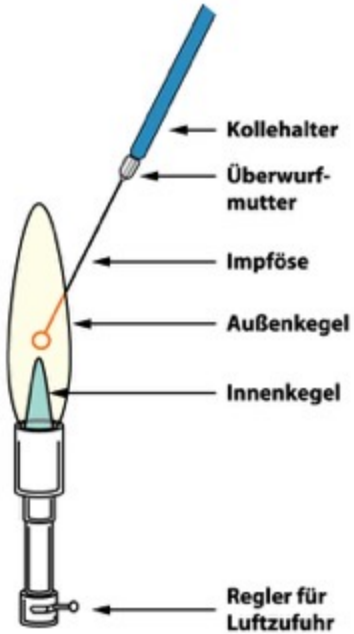


Beispiele bakterieller Kolonien

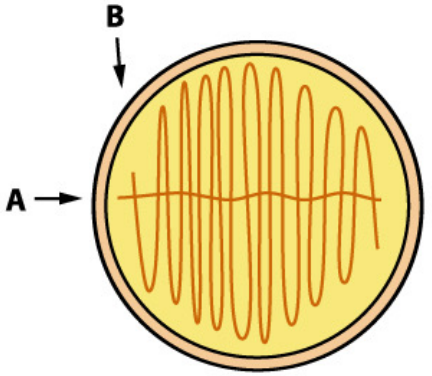
Kolonien sind sichtbare Anhäufungen von Zellen, die sich nach Teilung einer oder einiger Zellen bilden. Die Größe, Form, Maserung und Farbe einer Bakterienkolonie hängt von dem Organismus ab, der diese bildete.



Methode des **Verdünnungsausstrichs** zur Isolierung von Reinkulturen.

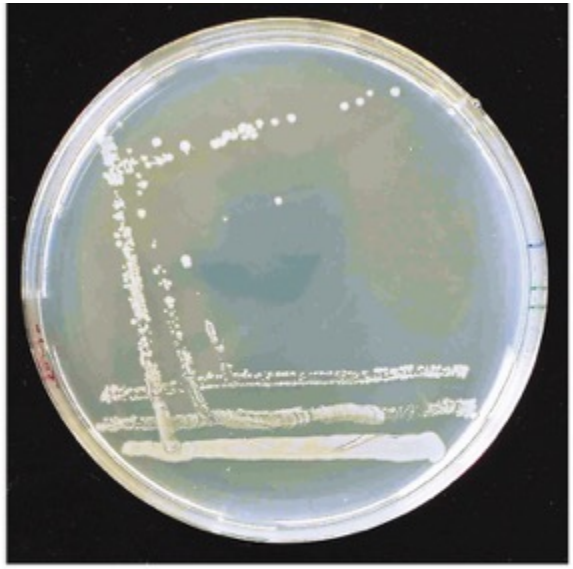


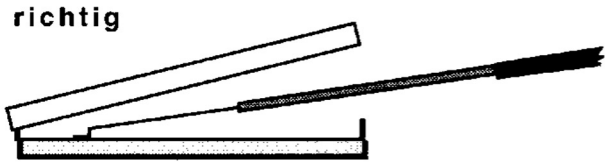
Kreuzstrich

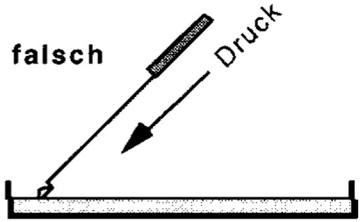


Verschiedene Arten
Des Ausstrichs

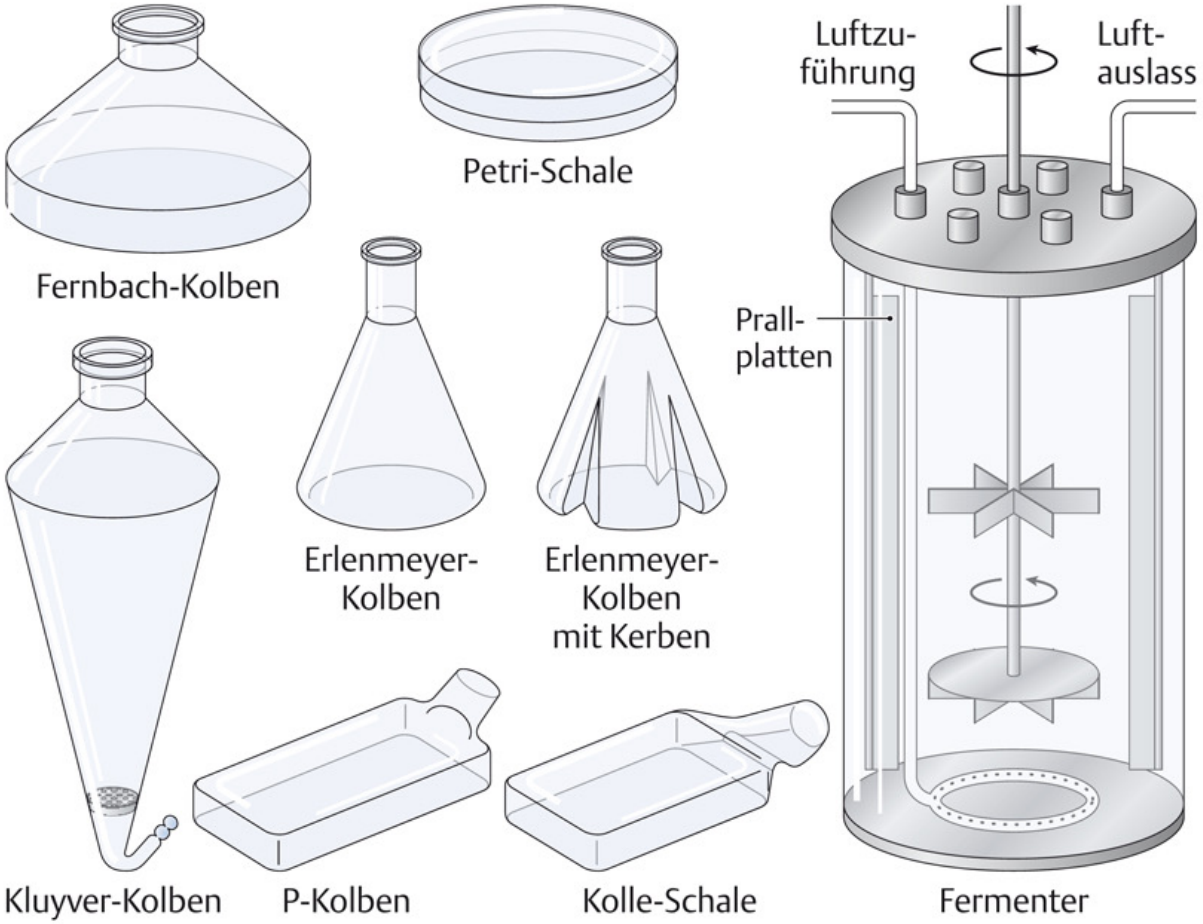
Dreistrich





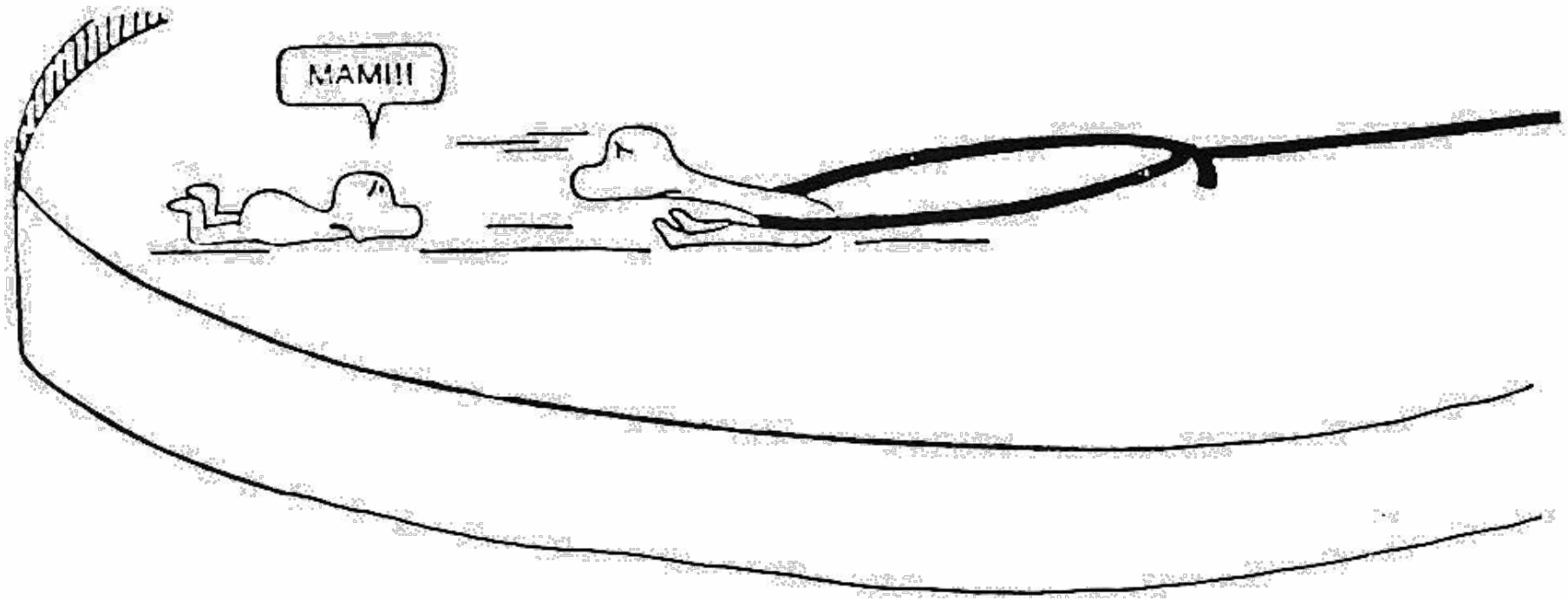


Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006



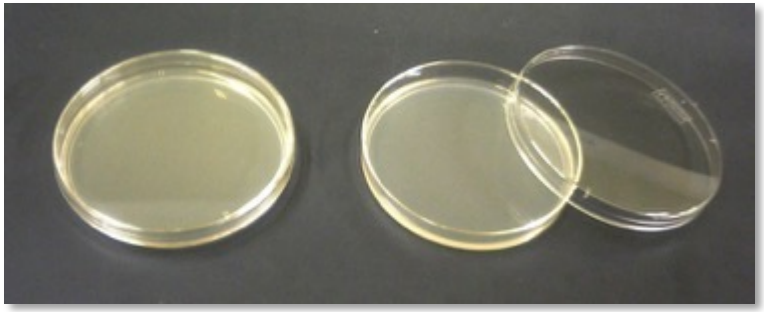
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Einzelkolonien sind erwünscht!



… auch wenn es manchmal schwer fällt!

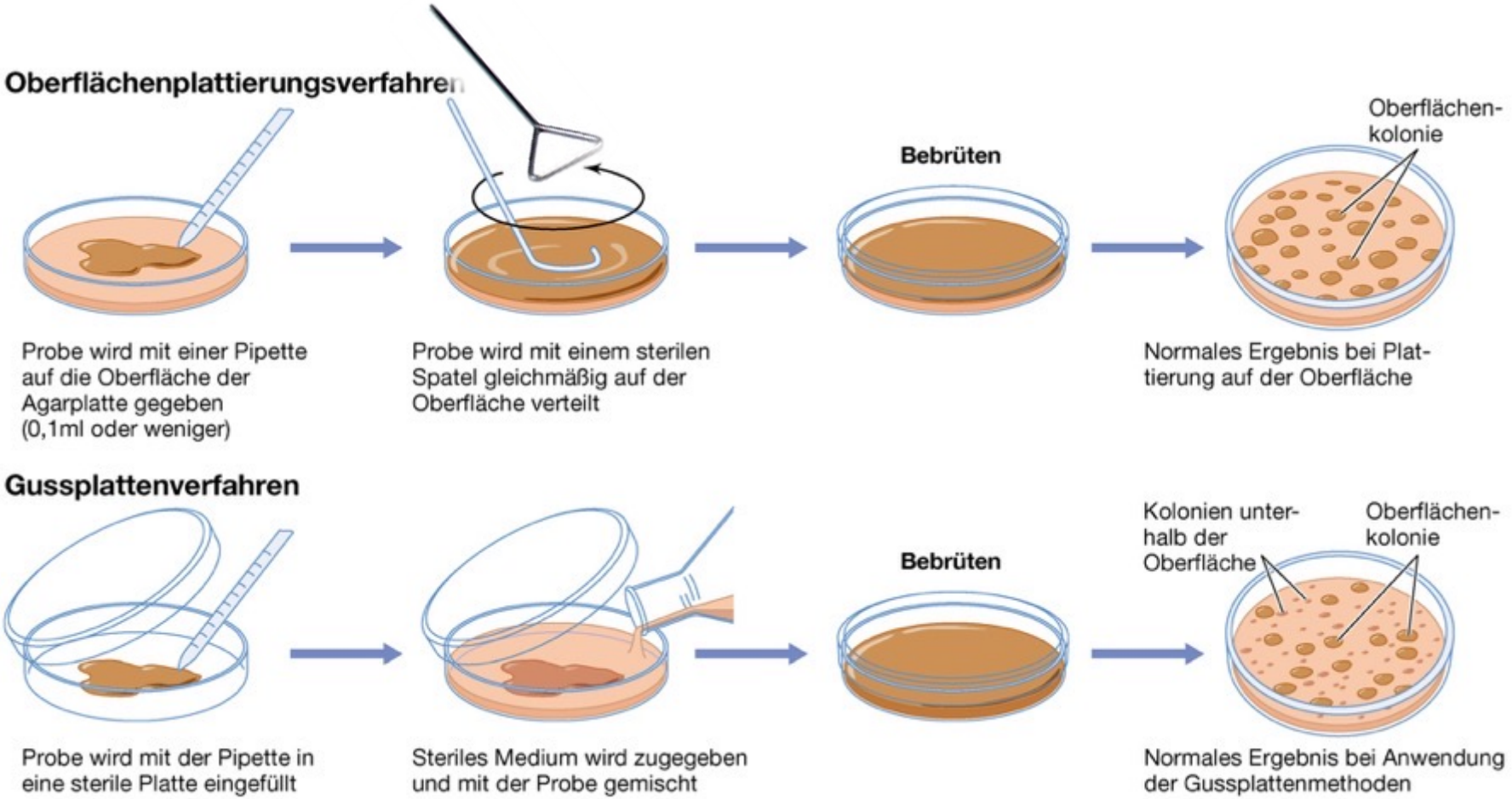
Gießen von Agarplatten im Stapel

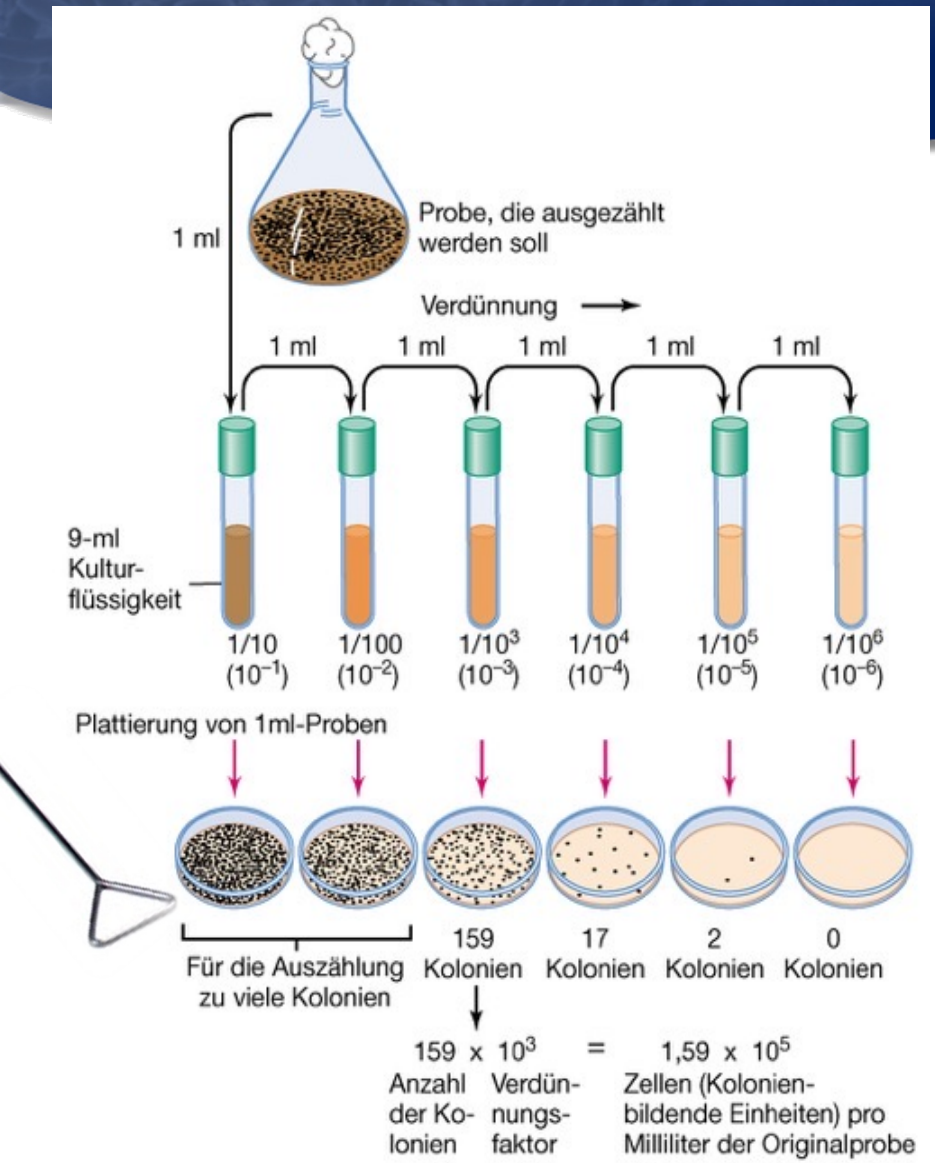


Karl Rudolf Arnold Arthur Wilhelm von Drigalski

*21. Juni 1871 in Dresden, † 12. Mai 1950 in Wiesbaden

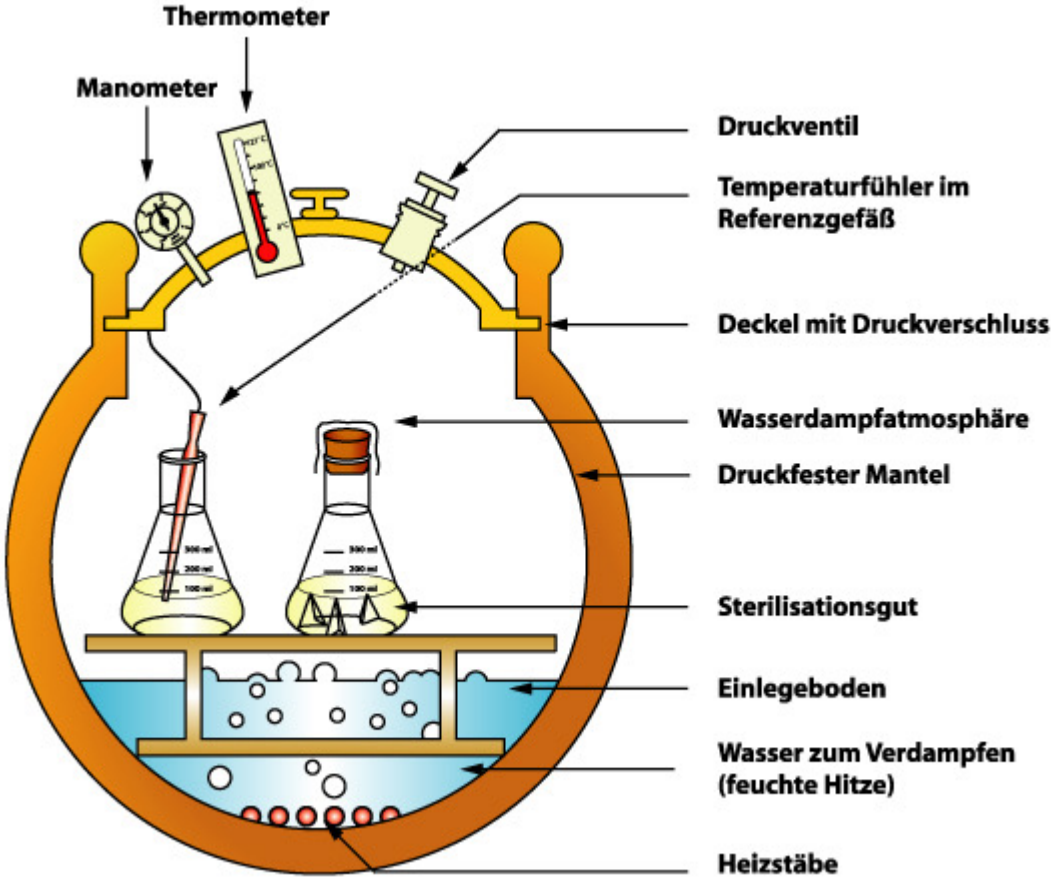
Prof. Dr. med., Stadtmedizinalrat und königlich preußischer Oberstabsarzt der preußischen Landwehr, war ein deutscher Bakteriologe


Oberflächenplattierungsverfahren
Bebrüten
Oberflächen-kolonie
Probe wird mit einer Pipette auf die Oberfläche der Agarplatte gegeben (0,1ml oder weniger)
Probe wird mit einem sterilen Spatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt
Normales Ergebnis bei Plattierung auf der Oberfläche
Gussplattenverfahren
Bebrüten
Kolonien unterhalb der Oberfläche
Oberflächen-kolonie
Probe wird mit der Pipette in eine sterile Platte eingefüllt
Steriles Medium wird zugegeben und mit der Probe gemischt
Normales Ergebnis bei Anwendung der Gussplattenmethoden

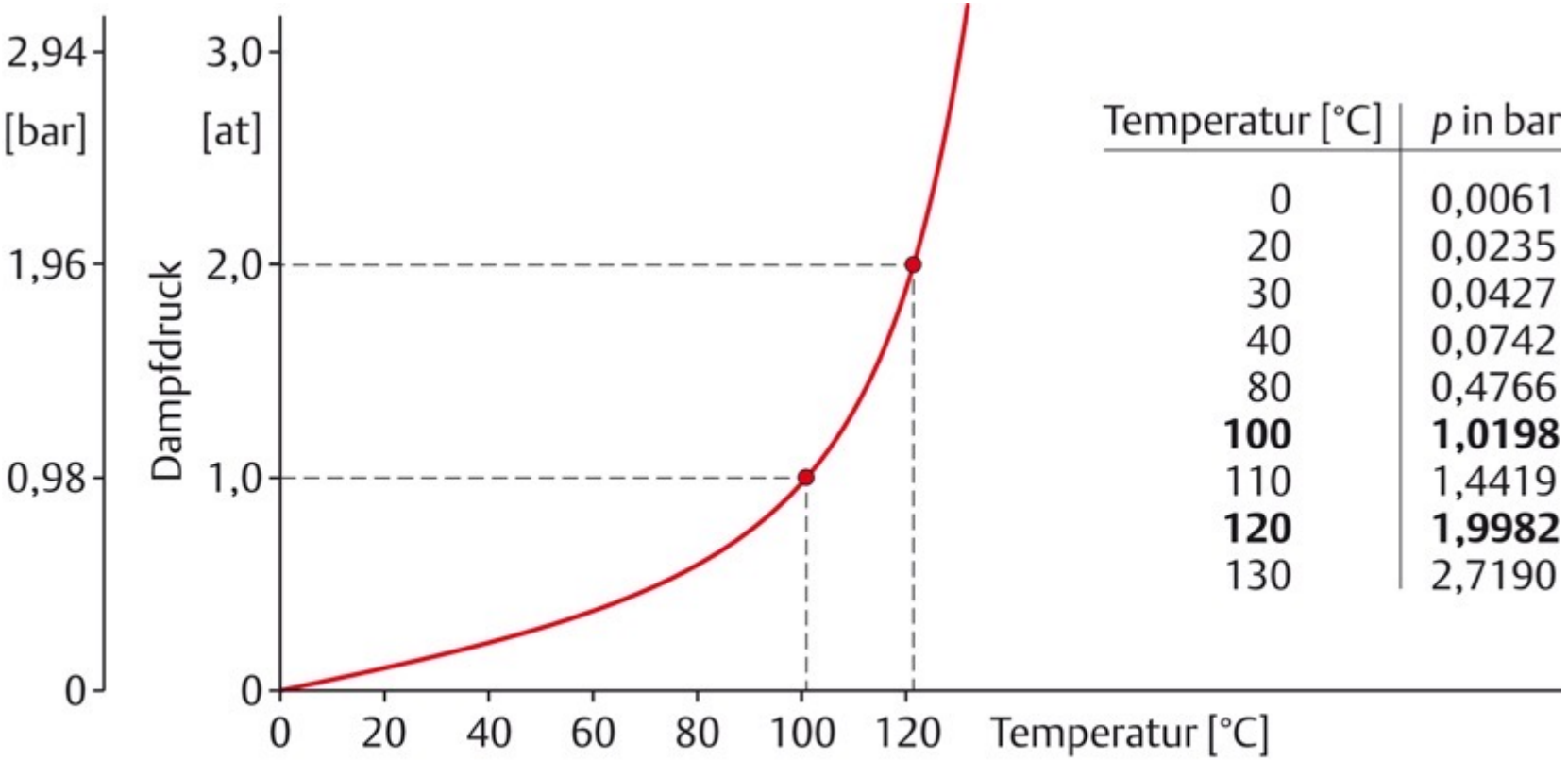


Auszählen von Kolonien auf Platten:
Bestimmung der **Lebendzellzahl** (CFU)
-immer Wiederholungen
-Kolonien zwischen 30 und 100 zählen

Bei der MPN-Methode wird nur kontrolliert, ob Wachstum im Reagenzglas stattfindet.



Typ. Aufbau eines Autoklaven zur Sterilisation



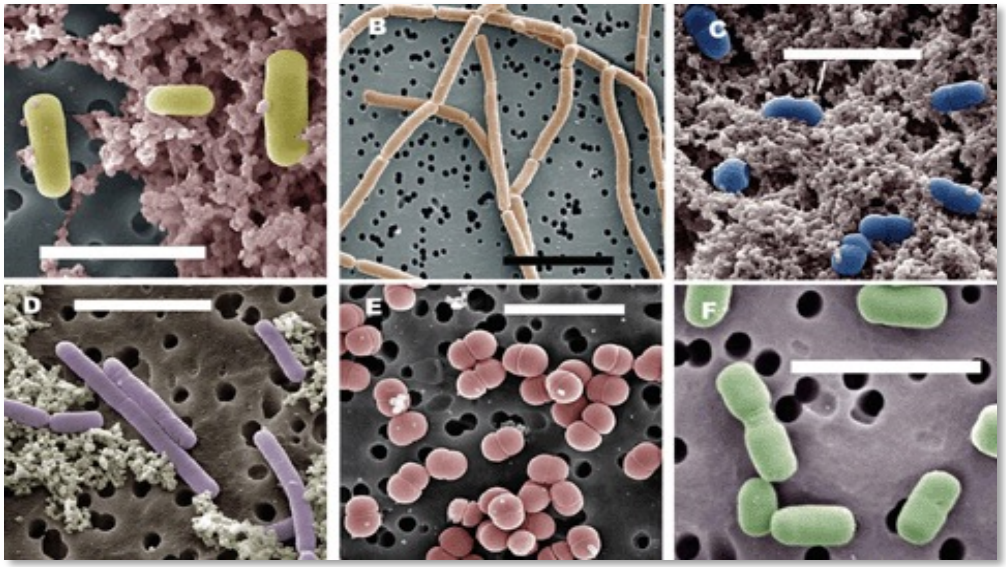
Temperatur [°C]	*p* in bar
0	0,0061
20	0,0235
30	0,0427
40	0,0742
80	0,4766
100	**1,0198**
110	1,4419
120	**1,9982**
130	2,7190

Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

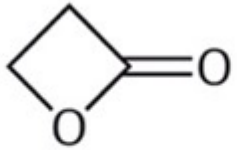
Um 121 °C zu erreichen wird 1 atm Überdruck benötigt

Steriltechniken

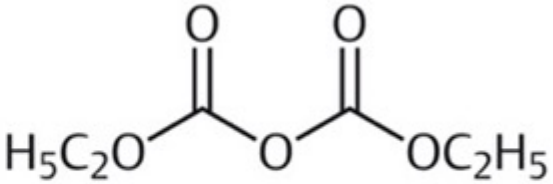
- Autoklavieren (feuchte Hitze) bei 121 °C, 1 atm Überdruck, 20 min
- Trockene Hitze bei 180 °C, mindestens 30 min
- Alkohol (70%) für temperaturempfindliche Materialien
- Filtration, Porengröße 0,2 µm
- UV- und radioaktive Strahlen
- Chemische Agenzien



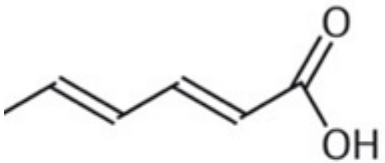
Ethylenoxid



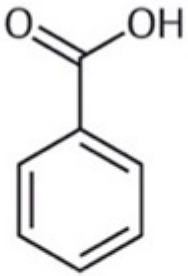
β-Propiolacton



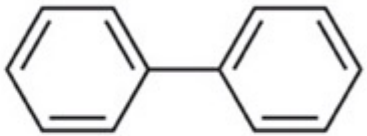
Diethyldicarbonat



Sorbinsäure



Benzoesäure

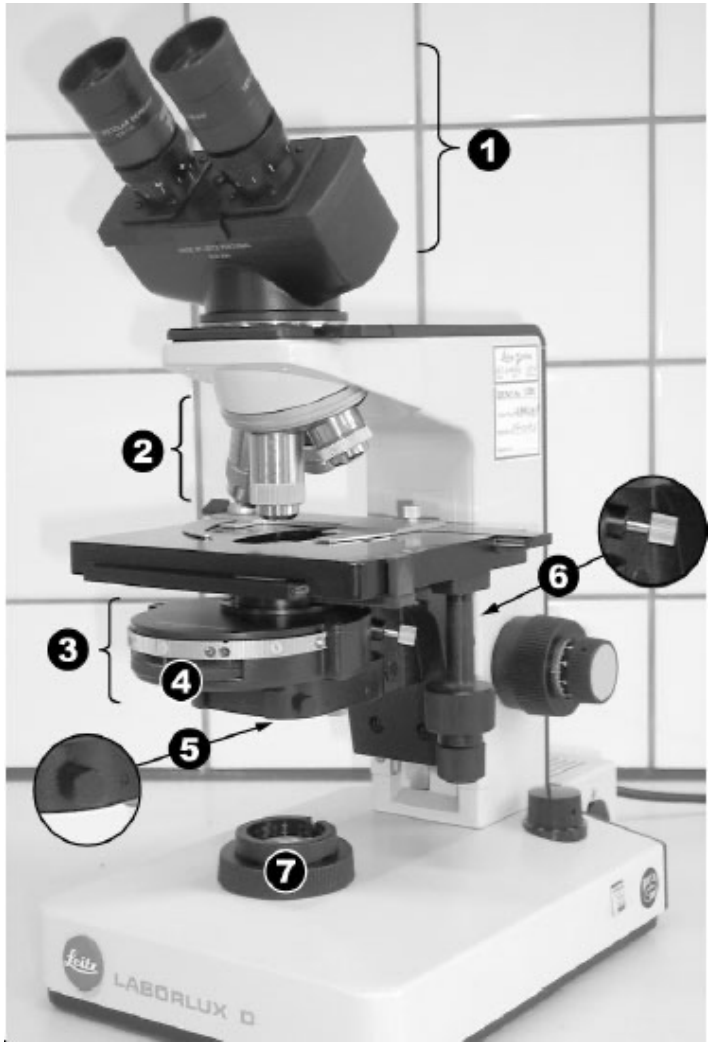


Biphenyl

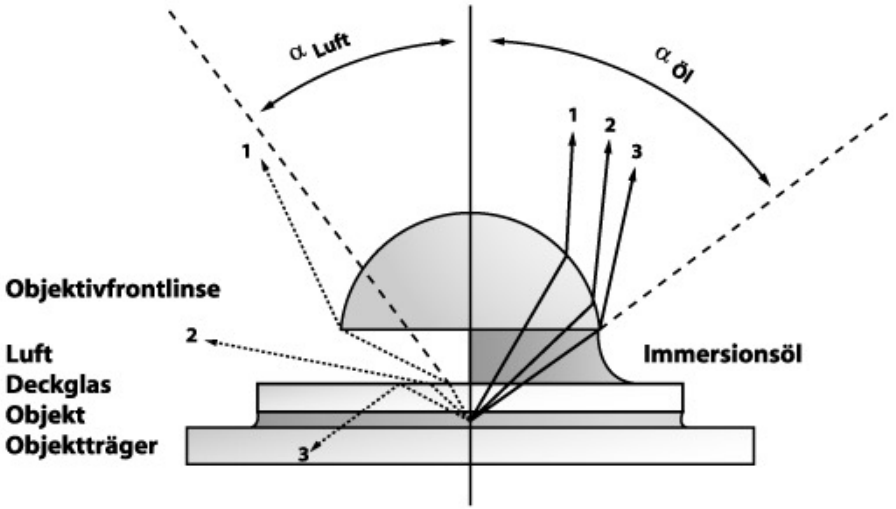
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Sterilisationsmethoden und ihre Anwendungsbereiche

Verfahrensart	Methode	Anwendungsbereiche
Hitzesterilisation	Trockene Hitze (160-200 °C), 30-180 min)	Geräte aus Glas, Metall, Keramik, Teflon
Dampfsterilisation	Feuchte Hitze (Autoklavieren: 121 °C, 2 bar, 15-30 min oder 134 °C, 3 bar, 5-20 min)	Lösungen, Nährmedien, Gummi, einige Kunststoffe, infektiöses Material
Gassterilisation	Ethylenoxid, Formaldehyd	Kunststoff-Einwegmaterial, Räume
Strahlensterilisation	Ionisierende Strahlen	Hitzeempfindliches Material (medizinisches Verbrauchsmaterial, Kunststoff-Einwegmaterial, Lebensmittel), sterile Werkbänke, Raumluft
Steril**filtration**	Filtration durch Filter mit einer Porengröße von nominal 0,2 µm, für Mycoplasmen 0,1 µm, für Viren 0,02-0,05 µm	Impfstoffe, Seren, andere hitzelabile Lösungen, z.B. Vitamine, Gase
Plasmasterilisation	Wasserstoffperoxid-Plasma	Hitzelabile- und feuchtigkeitsempfindliche Materialien (z.B. Instrumente)



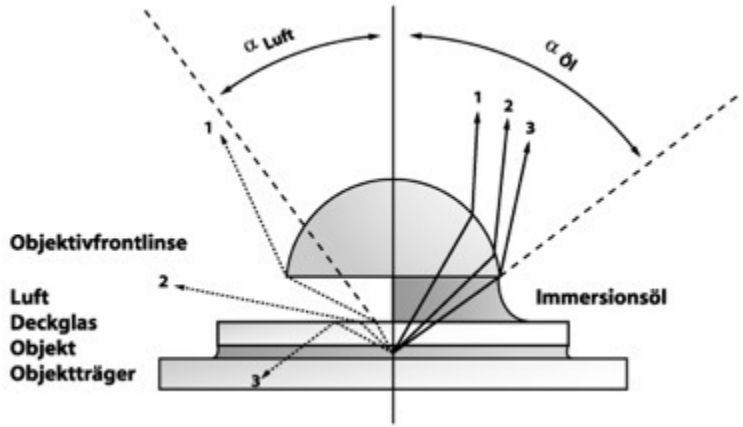
Pro Person gibt es ein **intaktes** Mikroskop
bitte sorgfältig damit umgehen!



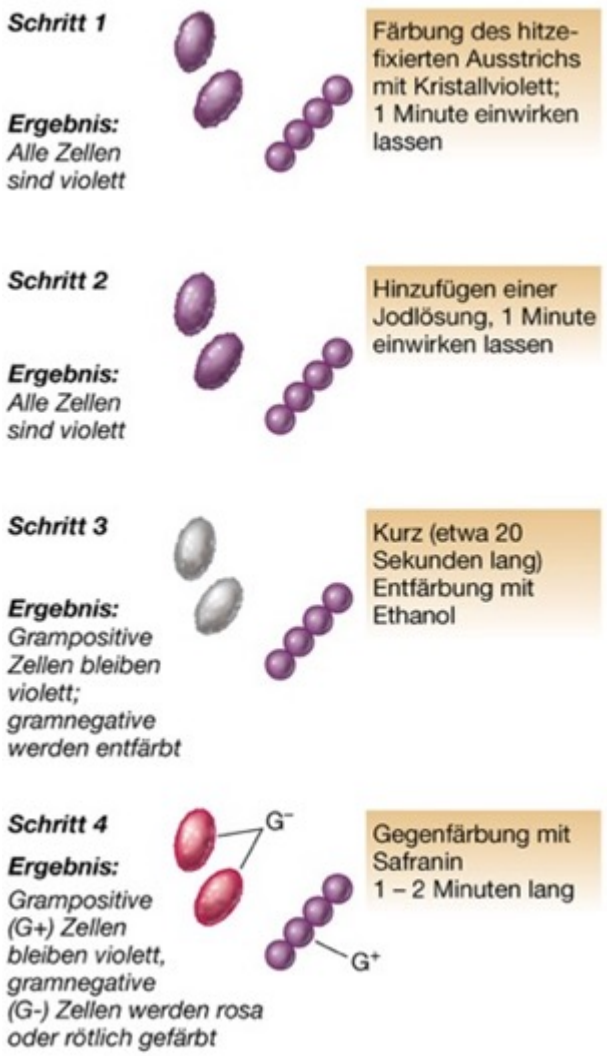
Verteilung einer dünnen Schicht des Präparats auf dem Objektträger
Lufttrocknung
I. Anfertigen eines Ausstrichs
Durchziehen des Präparats durch eine Flamme zur Hitzefixierung
Überschichten mit Farbstoff, abwaschen und trocknen
II. Hitzefixierung und Färbung
Objekt-träger
100×
Öl
Auftragen eines Öltropfens auf den Objektträger
Beobachtung mit Objektiv mit 100-facher Vergrößerung
III. Mikroskopie

Färbung von Zellen für die Untersuchung unter dem Mikroskop

Färbemittel verstärken den Kontrast zwischen den Zellen und ihrem Hintergrund.



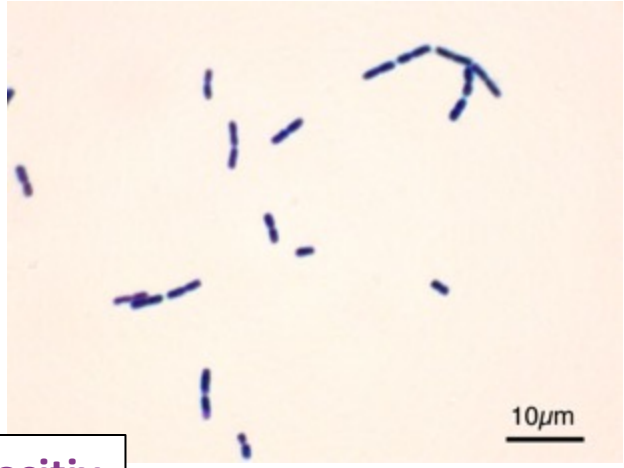
Gram-Färbung


Schritt 1
Färbung des hitze-fixierten Ausstrichs mit Kristallviolett; 1 Minute einwirken lassen
Ergebnis:
Alle Zellen sind violett
Schritt 2
Hinzufügen einer Jodlösung, 1 Minute einwirken lassen
Ergebnis:
Alle Zellen sind violett
Schritt 3
Kurz (etwa 20 Sekunden lang) Entfärbung mit Ethanol
Ergebnis:
Grampositive Zellen bleiben violett; gramnegative werden entfärbt
Schritt 4
Gegenfärbung mit Safranin 1 – 2 Minuten lang
Ergebnis:
Grampositive (G+) Zellen bleiben violett, gramnegative (G-) Zellen werden rosa oder rötlich gefärbt
G⁻
G⁺

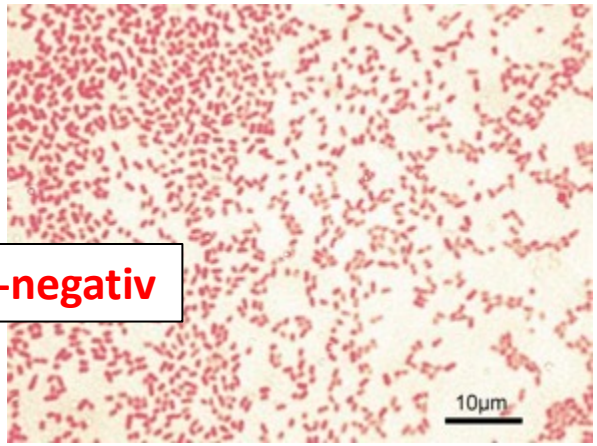
Hans Christian Joachim Gram

*13. September 1853 in Kopenhagen; † 15. November 1938

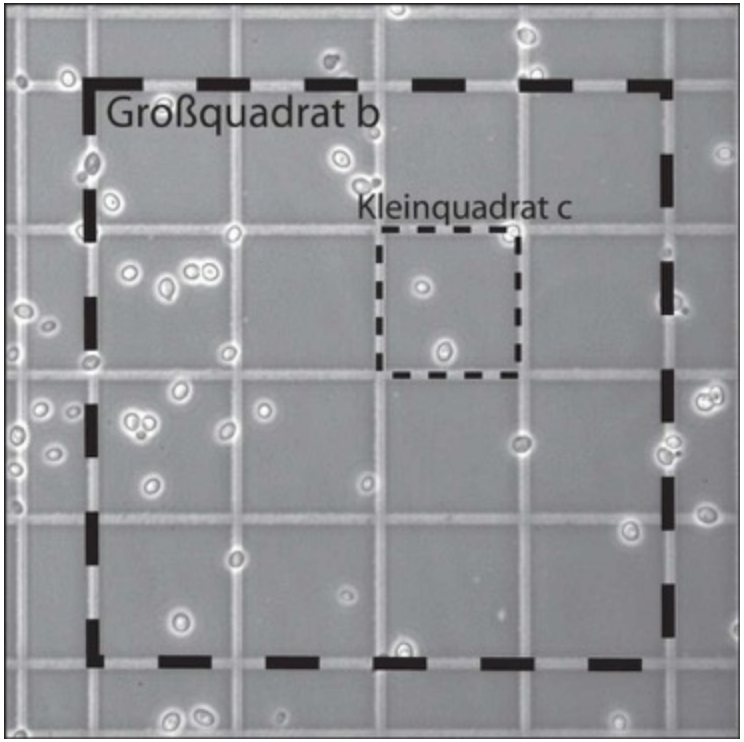
war ein dänischer Mikrobiologe

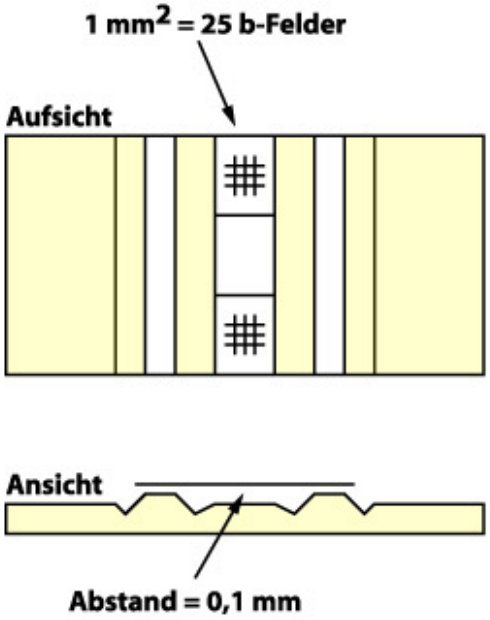


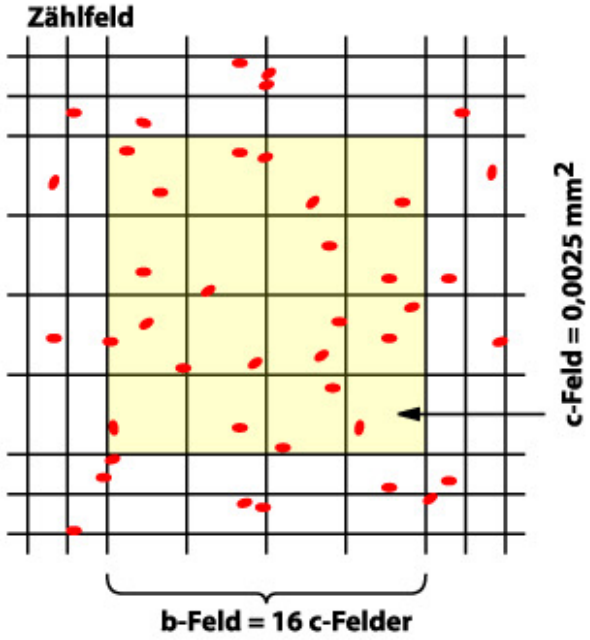
Bacillus sp. – Gram-positiv



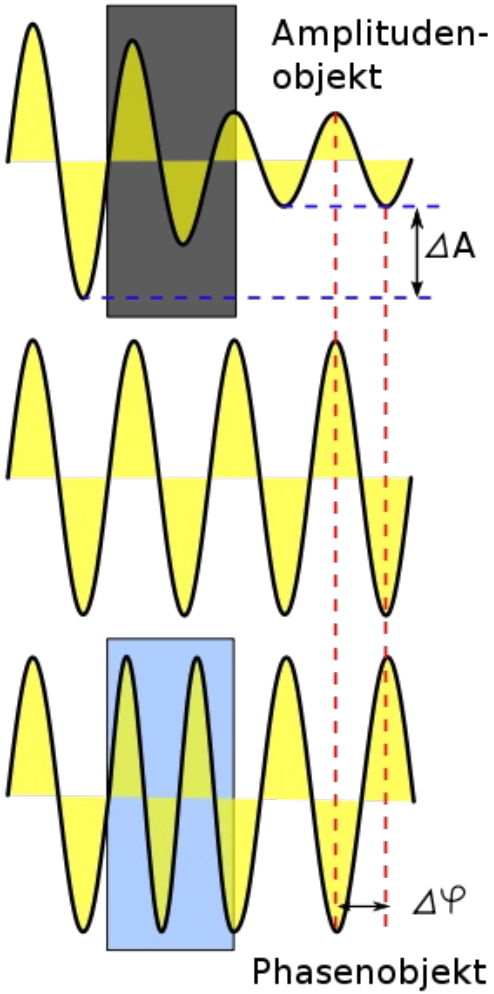
Pseudomonas sp. – Gram-negativ







Zählkammern: Bitte auf Angaben auf der Kammer achten, Thoma, Helber etc.
Ergebnis immer nur Gesamtzellzahl (Lebend und tot)



Phasenkontrastmikrokopie ist wichtig für die Darstellung sehr kleiner Objekte: z.B. Mikroorganismen

Licht breitet sich in Medien mit verschiedenen Lichtbrechungsindizes mit verschiedener Geschwindigkeit aus, daraus resultiert beim Durchlaufen eines Objekts, das optisch dichter ist (höherer Lichtbrechungsindex) als seine Umgebung (Hintergrund), ein Phasenunterschied gegenüber dem Licht der Umgebung (Hintergrundlicht).

Phasenkontrastmikroskopie nutzt den Phasenunterschied zur Erzeugung eines Kontrasts. Die Phase des Hintergrundlichts wird mittels eines Ringes aus optisch dichtem Material (Phasenring) so weit verschoben, dass das Hintergrundlicht bei Interferenz mit dem Objektlicht dieses möglichst weitgehend schwächt. Dadurch erscheint nun das Objekt dunkel vor hellem Hintergrund.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ **Superoxid**

$O_2^- + e^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2$ **Wasserstoffperoxid**

$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^\bullet$ **Hydroxylradikal**

$OH^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$ **Wasser**

Gesamtreaktion: $O_2 + 4\,e^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O$

(a) **Katalase:**

$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$

(b) **Peroxidase:**

$H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2\,H_2O + NAD^+$

(c) **Superoxiddismutase:**

$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

(d) **Superoxiddismutase/Katalase in Kombination:**

$4\,O_2^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O + 3\,O_2$

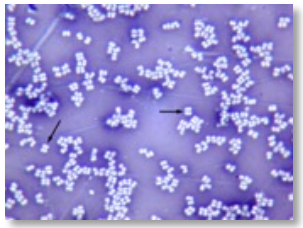
(e) **Superoxidreduktase:**

$O_2^- + 2\,H^+ + \text{cyt } c_{\text{reduziert}} \rightarrow H_2O_2 + \text{cyt } c_{\text{oxidiert}}$

Micrococcus luteus

- aerobes Bakterium
- Gram-positiv
- kokkenförmig in Paketen und Tetraden
- Durchmesser 0,5-3,5 µm
- pigmentierte Kolonien, orange bis gelb, Gelbfärbung durch Sarcinaxanthin
- Fähigkeit zur Synthese von Carotinoiden
- kreisförmige Kolonien mit glattem Kolonierand
- relativ tolerant gegen Austrocknung und hohe Salzkonzentrationen
- Katalase-positiv
- ubiquitär verbreitet in Boden, Wasser, Luft, Hautflora
- 2 bis 3 µm lang, 0,6 µm dick

Phylum:	Actinobacteria
Order:	Actinomycetales
Family:	Micrococcaceae
Genus:	Micrococcus
Species:	*M. Luteus*



Anreicherung schwefelfreier phototropher Bakterien

phototrophe Bakterien

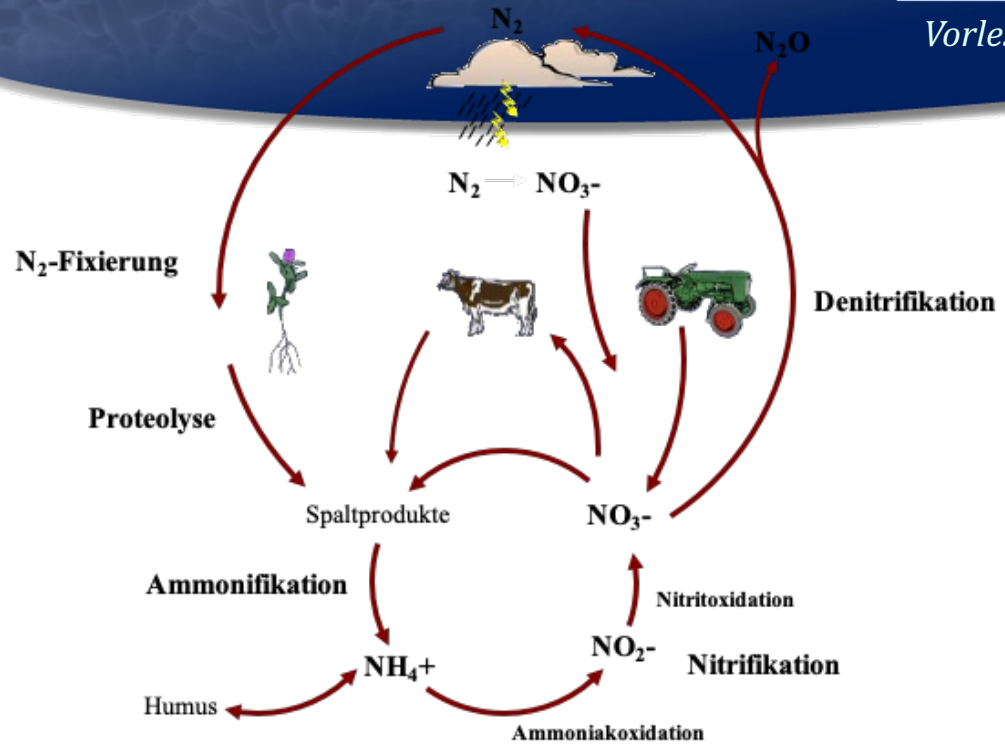
Cyanobakterien

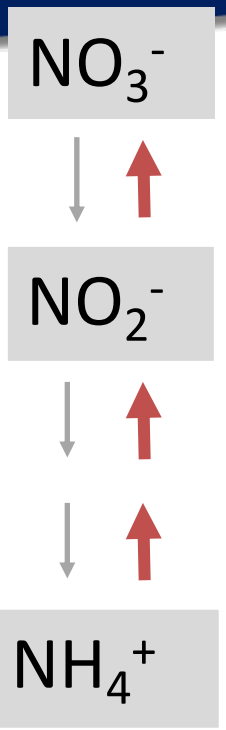
Grüne Schwefelbakterien

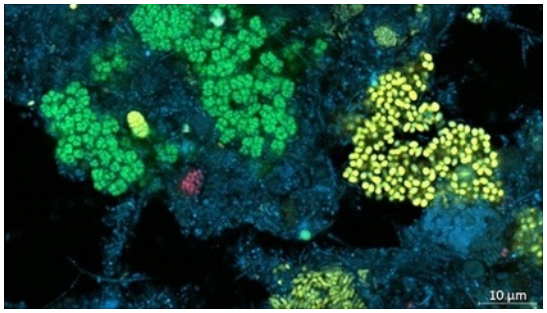
Grüne schwefelfreie Bakterien

Purpurbakterien

Heliobakterien





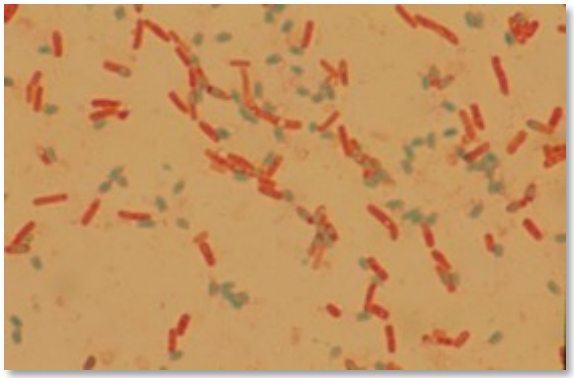


Bakterien als NoX-Killer:

Wie schließen Bakterien den N-Kreislauf?

Wie funktioniert eine Kläranlage?

Bacillus cereus



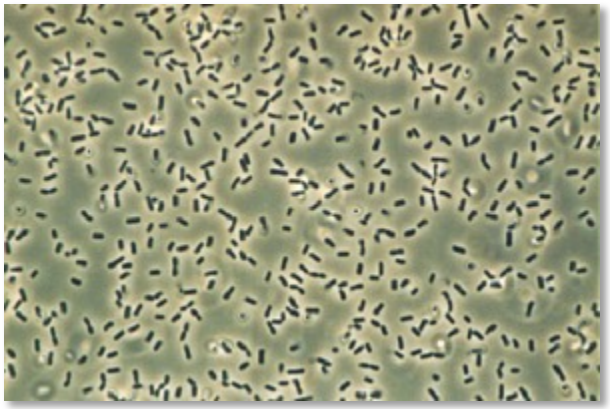
- Bakterium
- beweglich
- Gram-positiv
- stäbchenförmig
- oft große opake und ungefärbte Kolonien, häufig mit lappigen Auswüchsen
- Katalase-positiv
- Sporen bildend
- fakultativ anaerob
- Wachstum zwischen ca. 10- 45°C, Optimum ca. 28-35 °C Maximum 45 °C
- pH: Optimum 6,5-7,5
- hitzeresistente Sporen: es erfolgt keine Abtötung der Sporen durch Pasteurisierung

Bodenbakterium

Bacillus cereus bildet zusammen mit anderen Arten (*Bacillus anthracis* und *Bacillus thuringiensis*), die genetisch nahe verwandt sind, die *Bacillus-cereus* Gruppe

- Bakterium
- beweglich
- Gram-positiv
- stäbchenförmig
- Katalase-positiv
- Sporen bildend
- Aerob
- 2 bis 3 µm lang, 0,6 µm dick
- Peritrich begeisselt
- Boden- und Heubakterium
- Isolierung und Erstbeschreibung (Ehrenberg 1835)

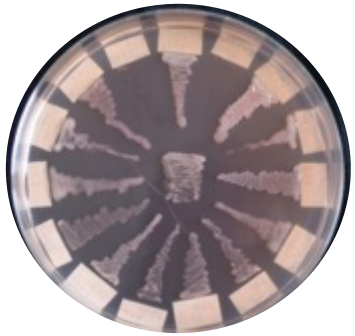
Bacillus subtilis



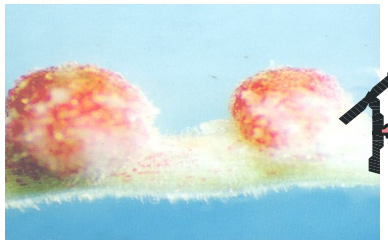
Abteilung:	Firmicutes
Klasse:	Bacilli
Ordnung:	Bacillales
Familie:	Bacillaceae
Gattung:	Bacillus
Art:	***Bacillus subtilis***

Phylum:	Proteobacteria
Class:	Alpha Proteobacteria
Order:	Rhizobiales
Family:	Rhizobiaceae
Genus:	Rhizobium Frank 1889

Rhizobium



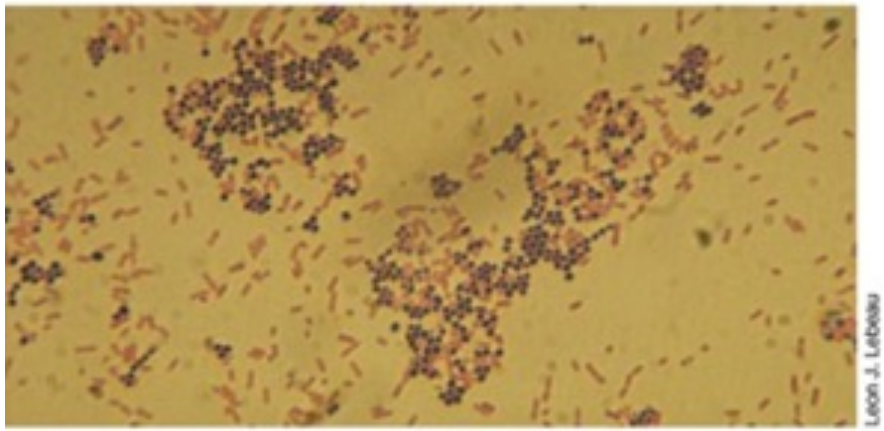
Knöllchen z.T. auch an Stengeln, z.B. photosynthetische Bradyrhizobien



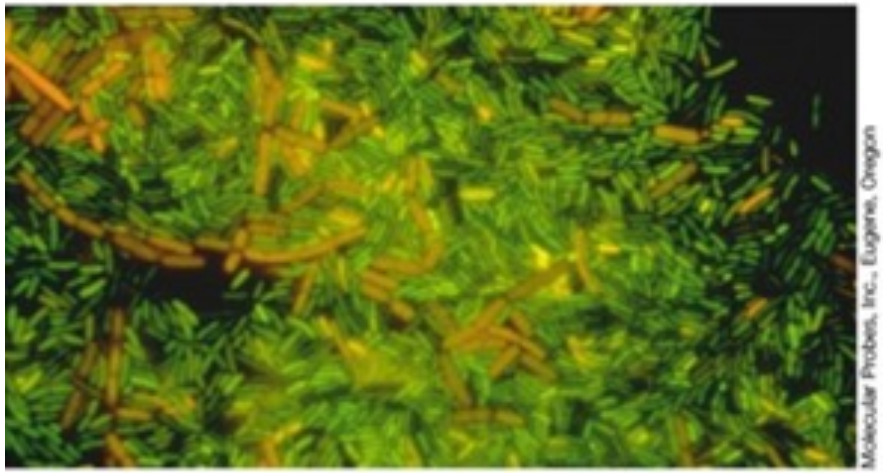
Rote Farbe: Leghämoglobin

Determinierte Knöllchen

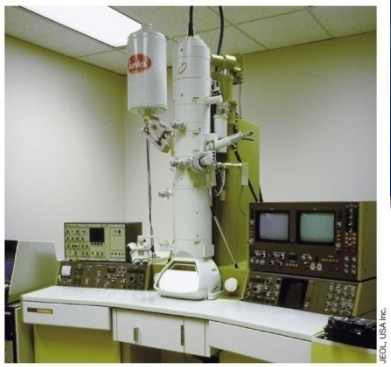
Nicht determinierte Knöllchen

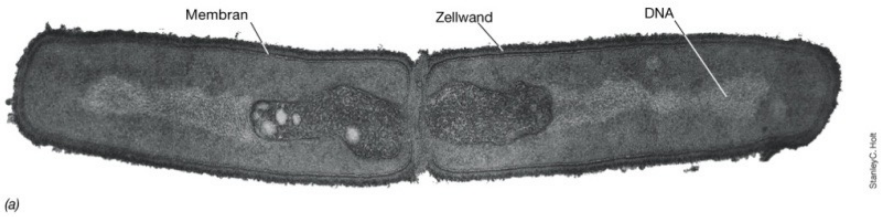


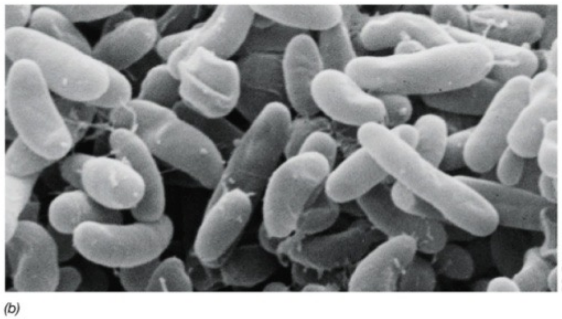
(b)



(c)

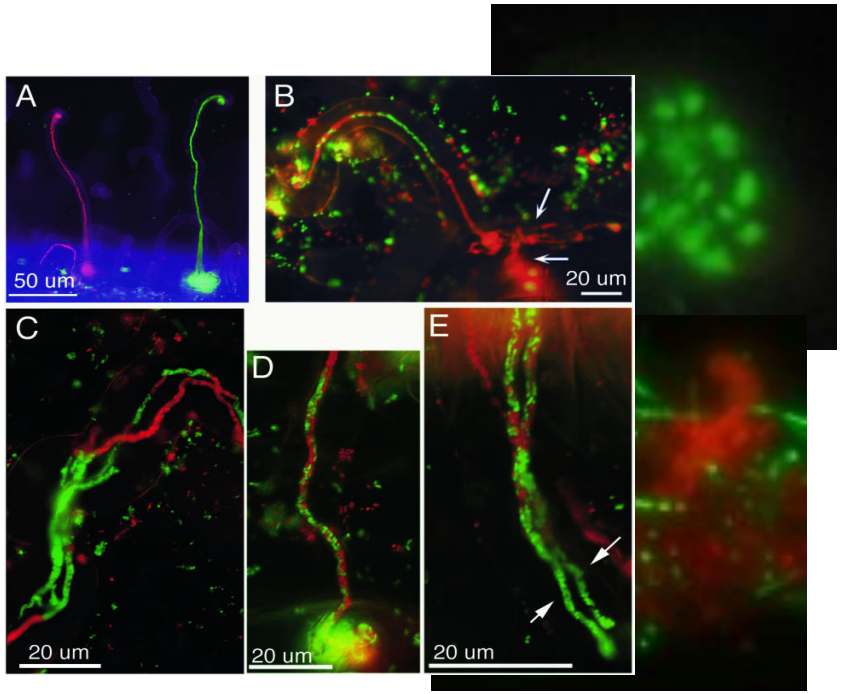




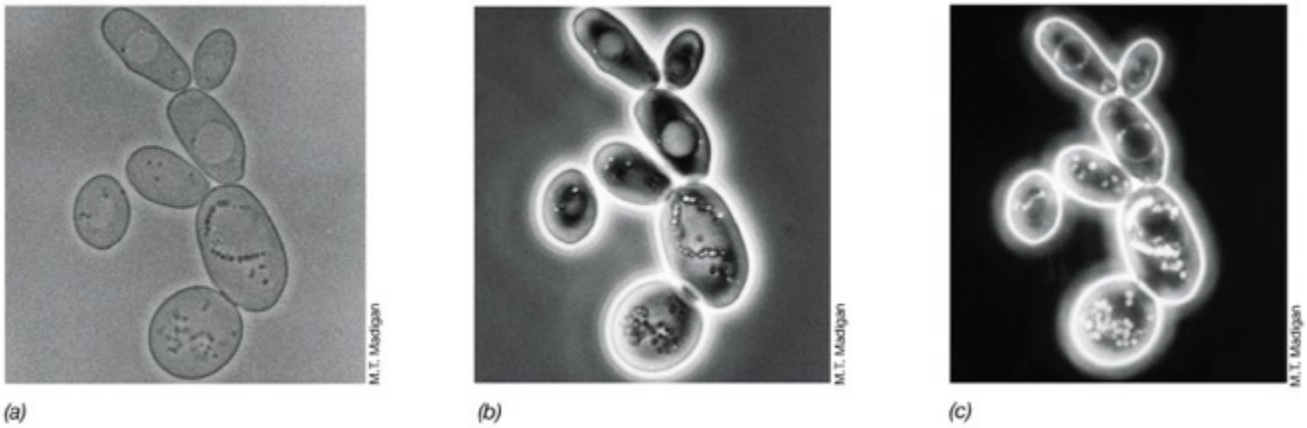


Elektronenmikroskop:
Transmissions- und
Rasterelektronenmikroskop

Konfokale Lasermikroskopie:
- Analyse von MO als Einzelorganismen oder Konsortien
- zur Analyse von lokaler Genexpression oder Zellstrukturen

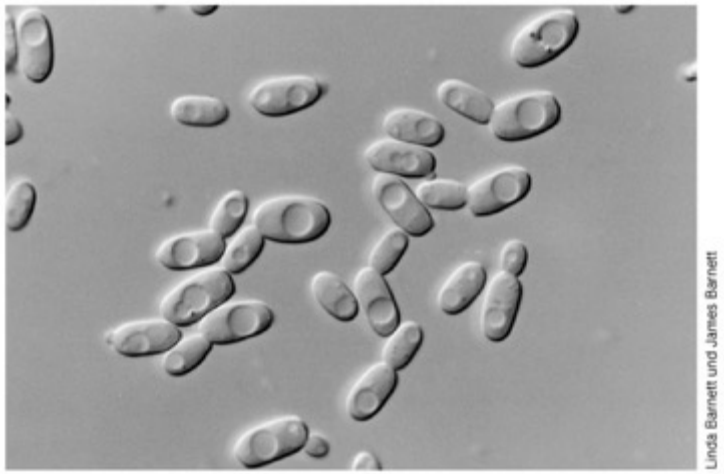


Ideale Objekte für die Mikroskopie sind Hefezellen:
Der Durchmesser der Zellen liegt im Allgemeinen bei 8-10 µm



(a) Hellfeldmikroskop (b) Phasenkontrastmikroskop (c) Dunkelfeldmikroskop

Mikroskopische Aufnahme des gleichen Bildausschnitts von Zellen der Bäckerhefe ***Saccharomyces cerevisiae*** mit verschiedenen Typen von Lichtmikroskopen



(a)

(b)

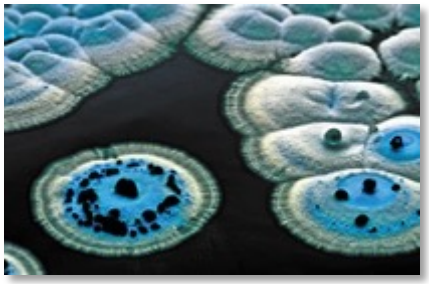
Dreidimensionale Aufnahmen von Zellen

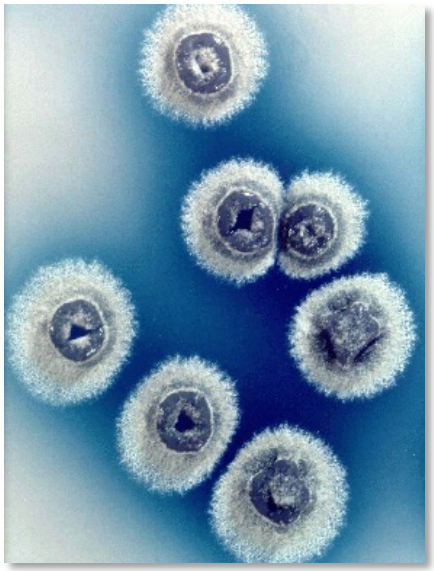
(a) Interferenzkontrastmikroskop von Hefezellen

(b) Rasterkraftmikroskop von Bakterienzellen
Bakterienzellen in (b) haben eine Länge von ungefähr 2,2 µm.

Streptomyces sp.

Langsam wachsende Kolonien mit in den Agar wachsendem Substratmycel, das später ein weißes Luftmycel mit grauen Konidiosporen entwickelt
Oft färbt sich der Agar durch lösliche Farbstoffe dunkel.

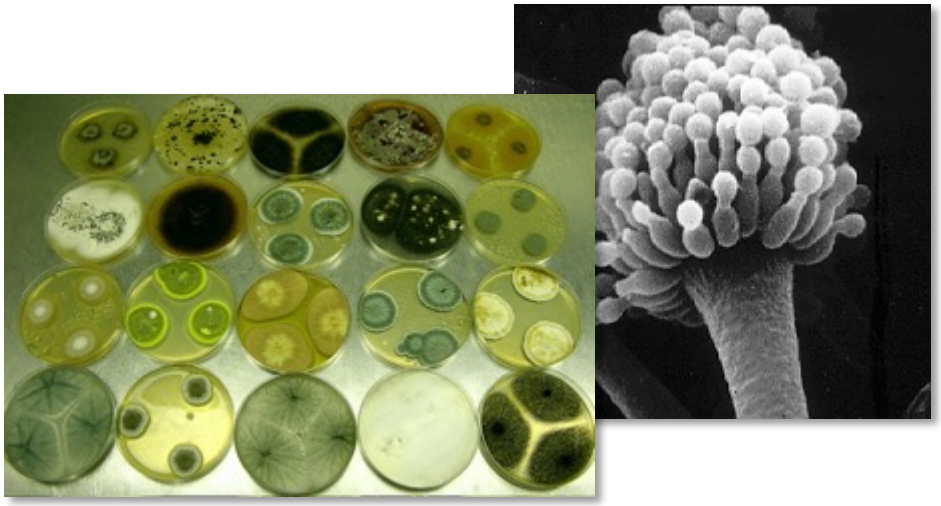




Phylum:	Actinobacteria
Order:	Actinomycetales
Family:	Streptomycetaceae
Genus:	***Streptomyces***

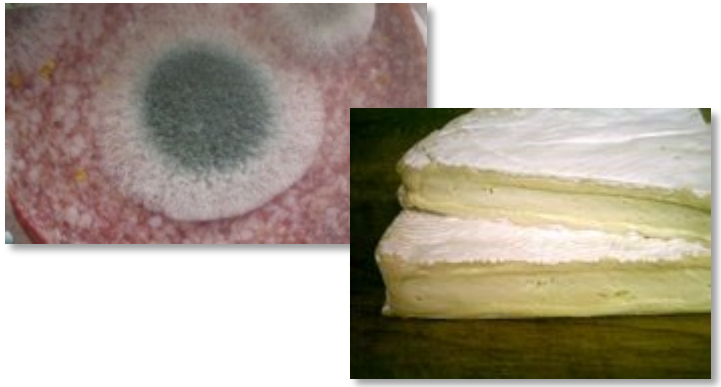
Streptomyces coelicor, Gram positiv, gute Antibiotikaproduzenten

Pilze (Ascomyceten):

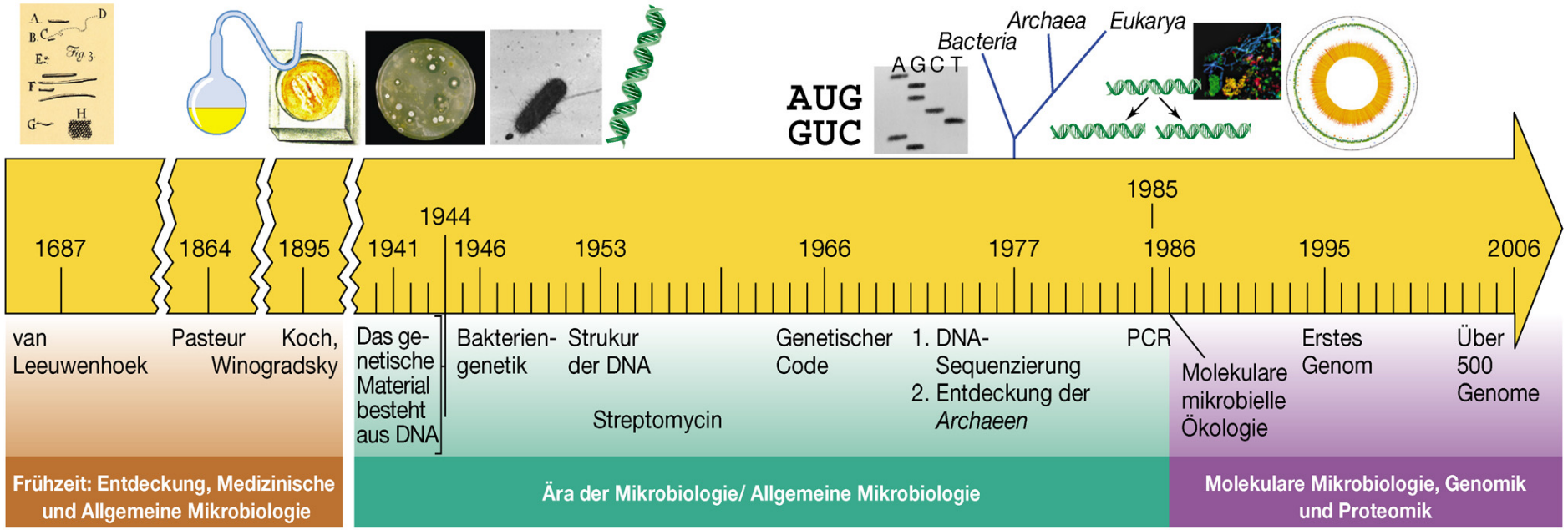


Aspergillus
(Gießkannenschimmel)

Penicillium
(Pinselschimmel)



Neurospora
(Brotschimmel)


AUG
GUC
AGCT
Bacteria
Archaea
Eukarya
1687
1864
1895
1941
1944
1946
1953
1966
1977
1985
1986
1995
2006
van Leeuwenhoek
Pasteur
Koch, Winogradsky
Das genetische Material besteht aus DNA
Bakterien-genetik
Strukur der DNA
Streptomycin
Genetischer Code
1. DNA-Sequenzierung
2. Entdeckung der *Archaeen*
PCR
Molekulare mikrobielle Ökologie
Erstes Genom
Über 500 Genome
Frühzeit: Entdeckung, Medizinische und Allgemeine Mikrobiologie
Ära der Mikrobiologie/ Allgemeine Mikrobiologie
Molekulare Mikrobiologie, Genomik und Proteomik